

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Kemangi (*Occimum cannum*)
terhadap Ekspresi Tumor Nekrosis Faktor Alfa (TNF- α) dan
Gambaran Histopatologi Bronkus pada Tikus Putih
(*Rattus norvegicus*) Jantan Model Asma yang
Diinduksi Ovalbumin (OVA) dan
Lipopolisakarida (LPS)**

Sebagai salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Kedokteran
Hewan

SKRIPSI

Oleh :

DYAH KUSUMANING WARDHANI

NIM. 135130101111021



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Kemangi (*Occimum cannum*)
terhadap Ekspresi Tumor Nekrosis Faktor Alfa (TNF- α) dan
Gambaran Histopatologi Bronkus pada Tikus Putih
(*Rattus norvegicus*) Jantan Model Asma yang
Diinduksi Ovalbumin (OVA) dan
Lipopolisakarida (LPS)**

Oleh :

DYAH KUSUMANING WARDHANI
135130101111021

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 19 Juli 2018
Dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh
Gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II

Dr. Agung Pramana Warih M, M.Si
NIP. 19650616 199111 1 001

drh.Viski Fitri Hendrawan, M.Vet
NIP. 19880518 201504 1 003

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 196009031 98802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dyah Kusumaning Wardhani

NIM : 135130101111021

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Kemangi (*Occimum cannum*) terhadap Ekspresi Tumor Nekrosis Faktor Alfa (TNF- α) dan Gambaran Histopatologi Bronkus pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Jantan Model Asma yang Diinduksi Ovalbumin (OVA) dan Lipopolisakarida (LPS).

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian Pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 06 Agustus 2018

Yang menyatakan,

(Dyah Kusumaning Wardhani)

NIM.135130101111021

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Kemangi (*Occimum cannum*) terhadap
Ekspresi Tumor Nekrosis Faktor Alfa (TNF- α) dan Gambaran
Histopatologi Bronkus pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)
Jantan Model Asma yang Diinduksi Ovalbumin (OVA)
dan Lipopolisakarida (LPS)**

ABSTRAK

Asma merupakan penyakit saluran pernafasan kronik yang merupakan hasil dari reaksi hipersensitivitas tipe I yang banyak dijumpai pada hewan dan manusia. Induksi model hewan asma menggunakan ovalbumin (OVA) dan diperparah dengan menggunakan Lipopolisakarida (LPS) dari bakteri *Phorphyromonas gingivalis*. Ekstrak daun kemangi mengandung senyawa flavanoid yang mampu menekan peradangan yaitu menghambat enzim siklogenase dan lipooksigenase serta penghambat pelepasan histamin. Metode penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan menggunakan 5 kelompok perlakuan yaitu kontrol negatif (tikus sehat), tikus yang diinduksi OVA secara intraperitoneal 1 mg/ekor tikus pada hari ke 1, 14, 21 dan LPS 1 mg/ekor, diberikan secara intrasulkuler pada hari ke 10,11 sebagai kontrol positif asma dan tiga kelompok perlakuan yang lainnya diinduksi dengan ovalbumin dan lipopolisakarida dengan dosis yang sama serta diterapi ekstrak etanol daun kemangi yang sudah diencerkan dengan aquadest selama 14 hari dengan dosis yang bertingkat 0,6 g/kg BB, 0,9 g/kg BB, dan 1,2 g /kg BB. Pengukuran kadar ekspresi TNF- α menggunakan metode imunohistokimia kemudian data dianalisis menggunakan uji *One Way ANOVA* dan pengamatan histopatologi organ bronkus menggunakan pewarnaan Hemaxtoxylin Eosin dengan mikroskop pada perbesaran 400x. Hasil penelitian menunjukkan pemberian ekstrak daun kemangi secara signifikan dapat menurunkan ekspresi *Tumor Necrosis Factor* (TNF- α) sebesar 78,53 % dan mempertahankan kondisi normal epitel pada bronkus dengan dosis terbaik pada terapi 1,2 g /kg BB. Kesimpulan dari penelitian ini adalah pemberian ekstrak daun kemangi dapat digunakan sebagai terapi tikus model asma.

Kata kunci : Asma, Bronkus, Kemangi, Tumor Necrosis Factor (TNF- α), Histopatologi bronkus

**The Effect of Basil Leaf Extract (*Occimum Cannum*) on Expression of
Alfa Factor Necrosis Tumor (TNF- α) and Description Bronchial
Histopathology in Male White Rats (*Rattus norvegicus*)
Asthma-induced Model of Ovalbumin (OVA)
and Lipopolysaccharide (LPS)**

ABSTRACT

Asthma is a chronic respiratory disease that caused hypersensitivity reactions type which is found mostly in animals and human beings. Models were induced using ovalbumin (OVA) and compounded by using Lipopolysaccharide (LPS) from *Phorphyromonas gingivalis* bacteria. Basil leaf extract contains flavanoid compounds that is capable of suppressing inflammation that inhibits the cyclooxygenase and lipooxygenase enzyme as well as inhibitors of histamine release. Methods of the study were Completely Randomized Design using 5 treatment groups: negative control (healthy rats), OVA-induced rats intraperitoneally 1 mg /a rat on day 1, 14, 21 and LPS 1 mg / a rat, given intraculcularly on day to 10.11 as a positive control and three other treatment groups induced by ovalbumin and lipopolysaccharide with the same dose and treated with basil leaf extract that have been diluted with aquadest for 14 days with doses of 0.6 g/kg BW, 0.9 g/kg BW, and 1.2 g/kg BW. Measurement of expression level of TNF- α using immunohistochemical method then data were analyzed using One Way ANOVA test and the histopathology of bronchus organ was observed using Hematoxylin Eosin staining with microscope at 400x magnification. The results showed that basil extract significantly decreased expression of Tumor Necrosis Factor (TNF- α) by 78,53% and retained normal condition of epithelium in bronchus with best dose at 1.2 g/ kg BW therapy. The conclusion of this research was basil leaf extract could be used as therapy of asthmatic in animal model rat.

Keywords: Asthma, Bronchus, Basil, Alfa Tumor Necrosis Factor (TNF- α),
Bronchial Histopathology

KATA PENGANTAR

Puji Syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT yang telah memberikan segala nikmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal Skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Kemangi (*Occimum cannum*) terhadap Ekspresi Tumor Nekrosis Faktor Alfa (TNF- α) dan Gambaran Histopatologi Bronkus pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Jantan Model Asma yang Diinduksi Ovalbumin (OVA) dan Lipopolisakarida (LPS)”.

Penulis mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada pihak-pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan Skripsi yaitu:

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya
2. Dr. Agung Pramana Warih Marhendra, M.Si selaku dosen pembimbing I atas bimbingan, kesabaran, fasilitas dan waktu yang telah diberikan.
3. Drh.Viski Fitri Hendrawan. M.Vet selaku dosen pembimbing II atas bimbingan, kesabaran, fasilitas dan waktu yang telah diberikan.
4. Drh. Dyah Ayu Oktavanie A.P., M.Biotech selaku Wakil Dekan I Bidang Akademik Fakultas Kedokteran Hewan.
5. Dhita Evi Aryani, S.Farm, Apt. selaku dosen penguji I yang telah memberikan saran dan kritik yang sangat membangun.
6. Dan Drh. Rahadi Swastomo, M.Biomed selaku dosen penguji II yang telah memberikan saran dan kritik yang sangat membangun.
7. Devi Intan Dyah Ayu Octaviani, Aisyah Nurwita Sari, Dedi Hartawan, dan Bima Anggara Putra selaku teman seperjuangan Skripsi
8. Ayahanda Suwarno, Ibu Dyah Rumpinuji dan kakak Dyah Pravita Wardani untuk kasih sayang, doa dan dukungan serta pengorbanan baik moril maupun materi selama ini.
9. Teman-teman TIVA yang telah memberikan persahabatan, semangat, inspirasi, keceriaan dan mimpi-mimpi yang luar biasa.

10. Sahabat tersayang khususnya Dwi Mutiara Sari dan Kurniati untuk dukungan semangat dan saran yang membangun.
11. Sertu Joko Suwardoyo untuk dukungan semangat, inspirasi, dan doa yang tiada henti selama ini.
12. Teman-teman seperjuangan mahasiswa FKH UB angkatan 2013 yang telah memberikan semangat dan dukungan kepada penulis.
13. Semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyusunan laporan ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis berharap Skripsi ini dapat diterima sehingga dapat memberikan pengalaman serta wawasan baru terhadap penulis. Penulis menyadari bahwa Skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu kritik dan saran yang membangun dari semua pihak diharapkan demi penyempurnaan tulisan. Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan kepada penulis. Amin Ya Robbalamin.

Malang, 06 Agustus 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iii
ABSTRAK	iv
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Asma.....	5
2.1.1 Etiologi dan Gejala Klinis	5
2.1.2 Patomekanisme.....	5
2.2 Kemangi (<i>Occimum basilium</i>).....	6
2.3 Hewan Coba (<i>Rattus norvegicus</i>).....	7
2.4 Ovalbumin	9
2.5 Lipopolisakarida	9
2.6 Tumor Nekrosis Faktor Alfa (TNF- α).....	10
2.7 Histopatologi Paru (Bronkus).....	11
BAB III KERANGKA KONSEP.....	13
3.1 Kerangka Konsep	13
3.2 Hipotesis Penelitian	16
BAB IV METODOLOGI PENELITIAN	17
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	17
4.2 Bahan dan Alat Penelitian	17
4.2.1 Bahan Penelitian.....	17
4.2.2 Alat Penelitian	17
4.3 Sampel Penelitian	18
4.4 Rancangan Penelitian	18
4.5 Variabel Penelitian	19
4.6 Tahapan Penelitian	19
4.6.1 Preparasi Hewan Coba (<i>Rattus norvegicus</i>).....	19
4.6.2 Hewan Model Asma.....	20
4.6.3 Pembuatan Ekstrak Daun Kemangi.....	20
4.6.4 Pemberian Terapi Ekstrak Kemangi.....	21
4.6.5 Pengambilan Organ Paru (Bronkus).....	21

4.6.6 Pembuatan Preparat Histopatologi	22
4.6.7 Pewarnaan <i>Hematoxylin Eosin</i>	23
4.6.8 Metode Immunohistokimia	24
4.6.9 Analisis Data	25
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	26
5.1 Pengaruh Pemberian Terapi Ekstrak Daun Kemangi (<i>Ocimum cannum</i>) Terhadap Ekspresi TNF- α Pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Jantan Model Asma.....	26
5.2 Asma Pengaruh Pemberian Terapi Ekstrak Daun Kemangi (<i>Ocimum cannum</i>) Terhadap Histopatologi Bronkus Pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Jantan Model Asma.....	32
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	37
6.1 Kesimpulan	37
6.2 Saran	37
DAFTAR PUSTAKA	38
LAMPIRAN.....	43



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rancangan Penelitian.....	18
5.1 Persentase area ekspresi TNF- α bronkus	28
L.6.1 Komposisi Larutan	51
L.6.2 Rataan Ekspresi TNF- α	59
L.6.3 Uji Deskriptif.....	61
L.6.4 Uji Homogenitas.....	61
L.6.5 Uji Normalitas Data.....	62
L.6.6 ANOVA.....	62
L.6.7 BNJ.....	63
L.6.8 Presentase TNF- α	64



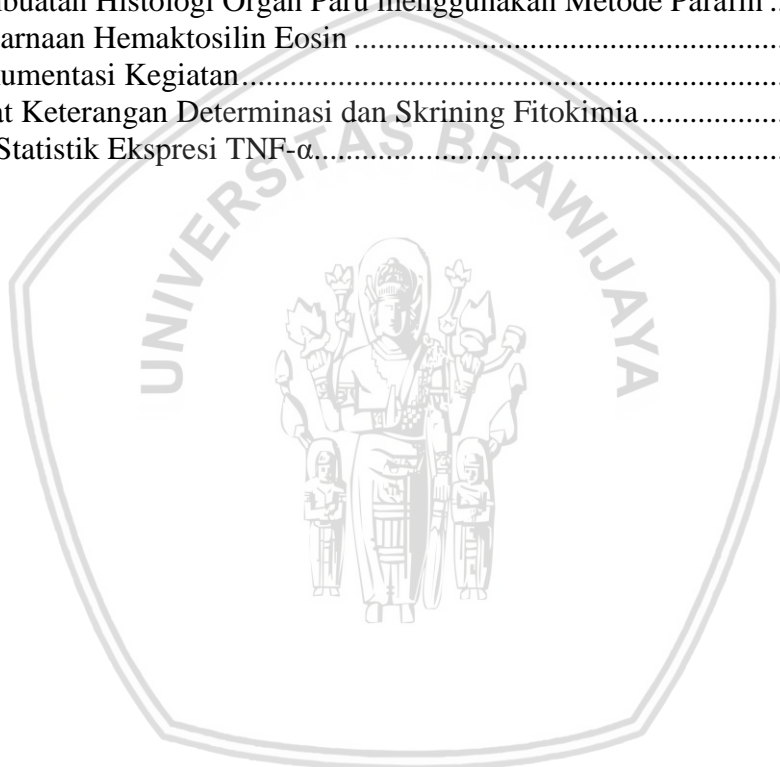
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Kemangi (<i>Ocimum cannum</i>)	7
2.2 Histopatologi epitel bronkus tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) dengan Pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE) pada perbesaran 400 kali	12
3.1 Kerangka Teori	13
5.1 Hasil pewarnaan DAB IHK preparat Bronkus	27
5.2 Hasil pewarnaan HE preparat Bronkus	33
L.9 Dokumentasi Kegiatan	55



DAFTAR LAMPIRAN

Tabel	Halaman
1. Sertifikat Laik Etik.....	43
2. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian	44
2.1 Rancangan Perlakuan.....	44
2.2 Kerangka Operasional.....	45
3. Perhitungan Dosis	46
4. Pembuatan Estrak Kemangi	50
5. Komposisi Larutan.....	51
6. Metode Imunohistokimia	52
7. Pembuatan Histologi Organ Paru menggunakan Metode Parafin	53
8. Pewarnaan Hemaktosilin Eosin	54
9. Dokumentasi Kegiatan.....	55
10. Surat Keterangan Determinasi dan Skrining Fitokimia.....	57
11. Uji Statistik Ekspresi TNF- α	59



DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

Simbol/Singkatan	Keterangan
AIOH3	Alumunium Hidroksida
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
BB	Berat Badan
CD14	<i>Cluster of Differentiation-14</i>
COX	Siklooksigenase
DAB	<i>Diamino Benzidine</i>
FcεR1	<i>Fc epsilon Receptor 1</i>
HE	<i>Hematosilin Eosin</i>
Ig E	Imunoglobulin E
Ig G	Imunoglobulin G
IL	Interleukin
kD	Kilodalton
kg	kilogram
LBP	<i>Lipopolysacharide Binding Protein</i>
LPS	Lipopolisakarida
mg	miligram
OVA	Ovalbumin
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PFA 10%	<i>Paraformaldehyde Acid 10%</i>
PGE2	<i>Prostaglandin E2</i>
PUFA	<i>Polyunsaturated Fatty Acid</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Spesies</i>
Sel B	Sel Beta
Th2	T Helper 2
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
TLR-4	<i>tool-like receptor-4</i>
%	Persen
CTM	<i>Chlorphenamine Maleat</i>
g	gram
Na2Co3	<i>Natrium Carbonate</i>
HCl	Hydrogen Chloride
COX	siklooksigenase
LOX	lipooksigenase
LTB ₄	Leukotrin B ₄
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Pg	picogram
mL	mililiter

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Asma merupakan suatu penyakit inflamasi yang menyebabkan penyempitan saluran pernafasan (Nelson dan Weldon, 2007). Asma merupakan penyakit inflamasi dimana banyak sel yang berperan antara lain sel mast, eosinofil, limfosit T, makrofag, neutrofil, dan sel epitel. Gejala asma biasanya ditandai dengan episodik berulang berupa batuk, sesak nafas, *wheezing* (mengi) dan rasa berat di dada. Adapun penyebab terjadinya asma dikarenakan alergen, virus, iritan, yang dapat menginduksi respon inflamasi. Faktor lain yang mempengaruhi asma adalah faktor genetik, asap rokok, polusi udara, dan perubahan cuaca (Rengganis, 2008).

Berdasarkan catatan *Global Initiative for Asthma* (GINA, 2011) terdapat 300 juta penderita asma di seluruh dunia, dan 255.000 diantaranya meninggal. Di Indonesia pasien asma sekitar 2-5% dari total jumlah penduduk. Asma juga sering kali menyerang hewan terutama kucing. Prevalensi asma pada kucing sekitar 1-5% dari jumlah populasi seluruh dunia (Reinero, 2013). Pada tahun 2014, tercatat lebih dari 800.000 populasi kucing domestik di Amerika menderita asma akut maupun kronis (Ewing, 2014).

Salah satu alergen adalah ovalbumin yang menjadi bahan sensitisasi respon imun ke Th2 untuk mengaktifkan sel B menjadi sel B plasma yang kemudian akan menghasilkan Ig E. Ig E kemudian berikatan dengan sel mast sehingga menyebabkan degranulasi sel mast dan menghasilkan mediator inflamasi berupa histamin, prostaglandin, sitokin dan leukotrin. Produk hasil dari mediator

inflamasi akan mengakibatkan kerusakan dari bronkus dan meningkatkan sitokin pro inflamatori seperti TNF- α (Rengganis, 2008). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Utomo (2012) bahwa paparan lipopolisakarida (LPS) diketahui dapat menginduksi terjadinya inflamasi pada saluran pernafasan sehingga memperparah asma.

Kemangi (*Ocimum cannum*) merupakan tanaman yang mengandung flavonoid. Flavonoid berpotensi dalam menekan peradangan yaitu menghambat enzim siklooksigenase (COX) dan enzim lipooksigenase (LOX) (Kandaswami dkk., 2005). Flavonoid daun kemangi terdiri dari flavon apigenin, luteolin, flavon O-glikosida, flavon orientin dan vicienin (Sudarsono dkk., 2002). Pada kandungan senyawa flavonoid menunjukkan aktivitas berupa antioksidan dengan cara mendonasikan atom hidrogennya sehingga mengurangi paparan radikal bebas (Yao dkk., 2004).

Saat ini pengobatan asma dilakukan dengan obat-obatan bronkodilatator contohnya seperti salbutamol (albuterol). Namun penggunaan obat-obatan kimia tersebut memiliki beberapa efek samping (Gunawan dkk., 2007). Salah satu tanaman yang dapat dijadikan sebagai bahan obat adalah kemangi (*Ocimum cannum*) yang diduga memiliki efek sebagai anti-inflamasi dan anti-oksidan.

Penelitian menggunakan daun kemangi sebagai terapi asma belum pernah dilakukan, sehingga penelitian ini diharapkan untuk mengkaji pengaruh pemberian ekstrak daun kemangi (*Occimum cannum*) sebagai terapi asma yang mampu menurunkan kejadian inflamasi sehingga terjadi penurunan ekspresi sitokin TNF- α dan perbaikan gambaran histopatologi bronkus.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan berikut :

1. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak daun kemangi (*Ocimum cannum*) terhadap penurunan ekspresi TNF- α bronkus pada tikus (*Rattus norvegicus*) model asma?
2. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak daun kemangi (*Ocimum cannum*) terhadap perbaikan histopatologi bronkus pada tikus (*Rattus norvegicus*) model asma?

1.3 Batasan Masalah

1. Hewan model yang digunakan adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain Wistar yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan usia 8-12 minggu dengan berat 150-200 gram.
2. Keadaan asma pada hewan model tikus dilakukan dengan cara injeksi ovalbumin secara interperitoneal sebanyak 10 $\mu\text{g/ml}$ dan inhalasi sebanyak 1mg/ml, serta diperparah dengan menggunakan injeksi lipopolisakarida dari bakteri *Porphyromonas gingivalis* secara intrasulkuler sebanyak 1 $\mu\text{g/ml}$.
3. Kemangi yang dipakai adalah bagian daun kemangi yang didapat dari pasar Karangploso yang proses selanjutnya dilakukan pengeringan dalam

oven 40° C dan diekstraksi dengan menggunakan etanol 70% dengan metode maserasi.

4. Terapi pemberian ekstrak kemangi diberikan pada hewan coba dimulai pada hari ke-22, tiap hewan coba diberikan terapi secara per oral dengan dosis pemberian sebesar 0,6 g/kg BB, 0,9g/kg BB, dan 1,2 g/kg BB selama 14 hari.
5. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ekspresi TNF- α bronkus dengan metode Imunohistokimia (IHK) dan gambaran histopatologi bronkus dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) perbesaran 400x.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun kemangi (*Ocimum cannum*) terhadap penurunan ekspresi TNF- α bronkus pada tikus (*Rattus norvegicus*) model asma.
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun kemangi (*Ocimum cannum*) terhadap perbaikan histopatologi bronkus pada tikus (*Rattus norvegicus*) model asma.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat memberikan informasi tentang pemanfaatan ekstrak daun kemangi (*Ocimum cannum*) sebagai bahan terapi penyakit asma.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Asma

2.1.1 Etiologi dan Gejala Klinis

Asma merupakan suatu penyakit inflamasi saluran pernafasan yang menyerang semua kelompok umur. Asma ditandai dengan adanya serangan seperti sesak nafas yang berulang dan mengi sesuai dengan tingkat keparahannya (Katerin, 2014). Asma dapat juga didefinisikan merupakan penyakit inflamasi kronis yang menyebabkan hipersensitivitas pada bronkus terhadap berbagai rangsangan dengan gejala berupa batuk, sesak nafas, dan dada terasa berat. Asma dipengaruhi oleh dua faktor yaitu faktor lingkungan dan genetik (Rengganis, 2008). Serangan Asma dapat disebabkan oleh beberapa faktor antara lain virus, alergen, dan iritan yang menginduksi respon inflamasi (Sari, 2013).

2.1.2 Patomekanisme

Proses asma dapat melalui jalur imunologis yang didominasi oleh IgE, yang merupakan reaksi hipersensitifitas tipe I (tipe alergi). Pada asma alergi, antibodi IgE terutama melekat pada permukaan sel mast pada interstisial paru, yang berhubungan erat dengan bronkiolus dan bronkus kecil. Ketika alergen dihirup, akan terjadi fase sensitisasi, sehingga antibodi IgE tersebut meningkat. Alergen kemudian berikatan dengan antibodi IgE yang melekat pada sel mast dan menyebabkan sel ini berdegranulasi mengeluarkan berbagai macam mediator. Beberapa mediator yang dikeluarkan adalah histamin, prostaglandin dan leukotrin. Hal itu akan menimbulkan efek edema lokal pada dinding bronkiolus kecil, sekresi mukus yang kental dalam lumen bronkiolus, dan spasme otot polos

bronkiolus, sehingga menyebabkan inflamasi saluran napas. Spasme bronkus yang terjadi merupakan suatu respons terhadap mediator sel mast terutama histamin yang bekerja langsung pada otot polos bronkus. Sel-sel inflamasi seperti eosinofil, sel T, sel mast dan *Antigen Presenting Cell* (APC) merupakan sel-sel kunci dalam patogenesis asma (Rengganis, 2008).

Sitokin yang dilepas oleh sel mast seperti IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, dan TNF- α . *Tumor Necrosis Factor-Alpha* merupakan sitokin utama pada respon inflamasi akut terhadap bakteri gram negatif. Sitokin tersebut mengarahkan sel inflamasi seperti neutrofil dan eosinofil (Baratawidjaja dan Rengganis, 2013).

Sel neutrofil melepaskan metabolik oksigen, hidrogen peroksida, protease dan sumber mediator seperti prostaglandin dan leukotrin. Sel eosinofil melepaskan mediator seperti leukotrin dan radikal bebas, yang bersifat sangat toksik untuk saluran nafas (Mulia, 2000). Prostaglandin mengakibatkan dilatasi vaskuler dan bronkokonstriksi, sementara leukotrin berperan pada kontraksi otot polos, peningkatan permeabilitas vaskuler, dan produksi mukus (Baratawidjaja dan Rengganis, 2013).

2.2 Kemangi

Kemangi (*Ocimum cannum*) adalah tumbuhan keluarga Lamiaceae, berasal dari daerah tropis yaitu Asia, Afrika dan Amerika (**Gambar 2.1**). Kemangi digunakan sebagai sayur, lalap dan penyedap rasa oleh masyarakat Indonesia (Kardinan, 2003). Senyawa yang terkandung pada tanaman kemangi adalah flavonoid. Flavanoid daun kemangi terdiri dari flavon apigenin, luteolin, flavon O-glikosida, flavon orientin dan vicenin (Sudarsono dkk., 2002). Adanya senyawa

flavonoid menunjukkan aktivitas berupa antioksidan yaitu dengan cara mendonasikan atom hidrogennya sehingga mengurangi radikal bebas (Yao dkk., 2004). Dalam sistem klasifikasi menurut Tjiptrosoepomo (2002) kemangi diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Tubiflorae
Famili	: Lamiaceae
Genus	: Ocimum
Spesies	: <i>Ocimum cannum</i>



Gambar 2.1 Kemangi (*Ocimum cannum*)

2.3 Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Asma

Hewan laboratorium dapat digunakan sebagai media pengamatan dan penelitian laboratorik untuk mengembangkan ilmu pengetahuan. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) merupakan salah satu hewan yang telah diketahui sifat-

sifatnya secara baik, mudah dipelihara dan merupakan hewan adaptif serta cocok untuk berbagai penelitian. Tikus yang digunakan sebagai hewan model asma adalah *Rattus norvegicus* jantan strain Wistar, umur 10-12 minggu sehat, berat badan 150-200 gram. Klasifikasi tikus menurut (Armitage, 2004) yaitu :

Kingdom	: Animalia
Divisi	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i> L.
Strain	: Wistar

Penelitian Missebukpo dkk., (2013) hewan model asma yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi oleh ovalbumin (OVA) dan *Aluminium Hydroxide* (AIOH₃) sebagai sensitasi penginduksi asma. Penggunaan tikus putih pada hewan model asma juga dikarenakan tikus dapat memproduksi IgE terbesar yang merupakan antibodi anafilaksis (Hipersensitivitas terhadap alergen), mengalami *airway hiperactivity* yang lebih lama, dan memiliki hormon estrogen yang menstimulasi Th₂ (T helper-2) memproduksi sitokin serta meregulasi eosinofil selama pemberian alergen pada tikus asma (Zosky dkk., 2007).

2.4 Ovalbumin

Ovalbumin merupakan suatu alergen yang digunakan dalam pembuatan hewan model asma untuk menimbulkan peradangan pada paru-paru. Ovalbumin merupakan fosfolikoprotein monomer dengan berat molekul 43-45 kD (Huntington dan Stein, 2001). Ovalbumin telah terbukti dapat digunakan sebagai alergen untuk menimbulkan reaksi hipersensitivitas tipe I (Heripasetya, 2007). Paparan kronik ovalbumin sebagai alergen akan menimbulkan perubahan struktur dan terjadi inflamasi pada saluran pernafasan (Barlianto dkk., 2009). Pemberian ovalbumin memberikan peningkatan IgE dan terjadi inflamasi dengan gejala infiltrasi sel radang dan eosinofil pada histopatologi jaringan paru (Tang dkk., 2006).

2.5 Lipopolisakarida

Lipopolisakarida (LPS) merupakan dinding sel bakteri Gram negatif yang mampu memperparah keadaan asma. Lipopolisakarida yang digunakan berasal dari bakteri *Porphyromonas gingivalis* yang memiliki ciri-ciri tidak berspora, bakteri anaerob, dan tidak memiliki alat gerak (Iman dkk., 2011). LPS dapat dibagi menjadi tiga bagian : Lipid A, polisakarida inti, dan polisakarida O (Wang dan Quinn, 2010). Lipid A adalah glikolipid yang terdiri dari disakarida glukosamin yang tersubstitusi ikatan beta (1,6)-nya Lipid A bertanggung jawab terhadap efek beracun dengan cara menstimulasi pembentukan dan sekresi sitokin (IL-10 dan TNF). Polisakarida inti adalah kompleks polisakarida kompleks yang biasanya terhubung dengan lipid A melalui ikatan 3-deoksi-D-manno-octulosonat

(KDO). Rantai spesifik O terdiri dari rantai subunit oligosakarida identik linear atau bercabang dengan panjang yang bervariasi (Singleton dan Sainsbury, 2006).

Lipopolysaccharide-binding protein (LBP) merupakan suatu senyawa yang membantu lipopolisakarida agar terikat dengan dinding sel saluran pernafasan dan mengantarkan LPS dapat dikenali oleh CD14. Ikatan antara LPS dan CD14 yang melewati *Toll Like Receptor-4* (TLR-4) sehingga meningkatkan aktivasi sel dendritik dan Th2 yang mengakibatkan sel B memproduksi IgE menyebabkan remodeling jaringan saluran pernafasan dan inflamasi (Beumer dkk., 2003).

2.7 TNF- α (*Tumor Necrosis Factor Alfa*)

Tumor Necrosis Factor- Alpha (TNF- α) merupakan suatu sitokin utama pada respon inflamasi akut terhadap bakteri gram negatif dan mikroba lain. Sumber utama TNF- α adalah fagosit monokuler dan sel T yang diaktifkan antigen, sel NK, dan sel mast (Baratawidjaja dan Rengganis, 2013). Sistem imun berpengaruh terhadap tinggi dan rendahnya kadar TNF- α . Ketika sistem imun menurun maka tubuh akan lebih mudah terserang penyakit. Hal itu dikarenakan kemampuan imunitas tubuh yang lemah untuk melawan infeksi sehingga menyebabkan TNF- α diproduksi secara berlebihan dan kadar TNF- α meningkat (Baratawidjaja dan Rengganis, 2013).

Sekresi TNF- α akibat dari rangsangan LPS terhadap sel dendritik. Pada kadar rendah, TNF bekerja terhadap leukosit dan endotel, menginduksi inflamasi akut. Pada kadar sedang berperan pada inflamasi sistemik. Pada kadar tinggi, TNF menimbulkan kelainan patologik syok septik (Baratawidjaja dan Rengganis,

2013). Pada kejadian alergi, TNF- α dilepaskan oleh sel mast. Sitokin TNF- α mengerahkan sel inflamasi seperti neutrofil dan eosinofil.

2.8 Histopatologi Paru (Bronkus)

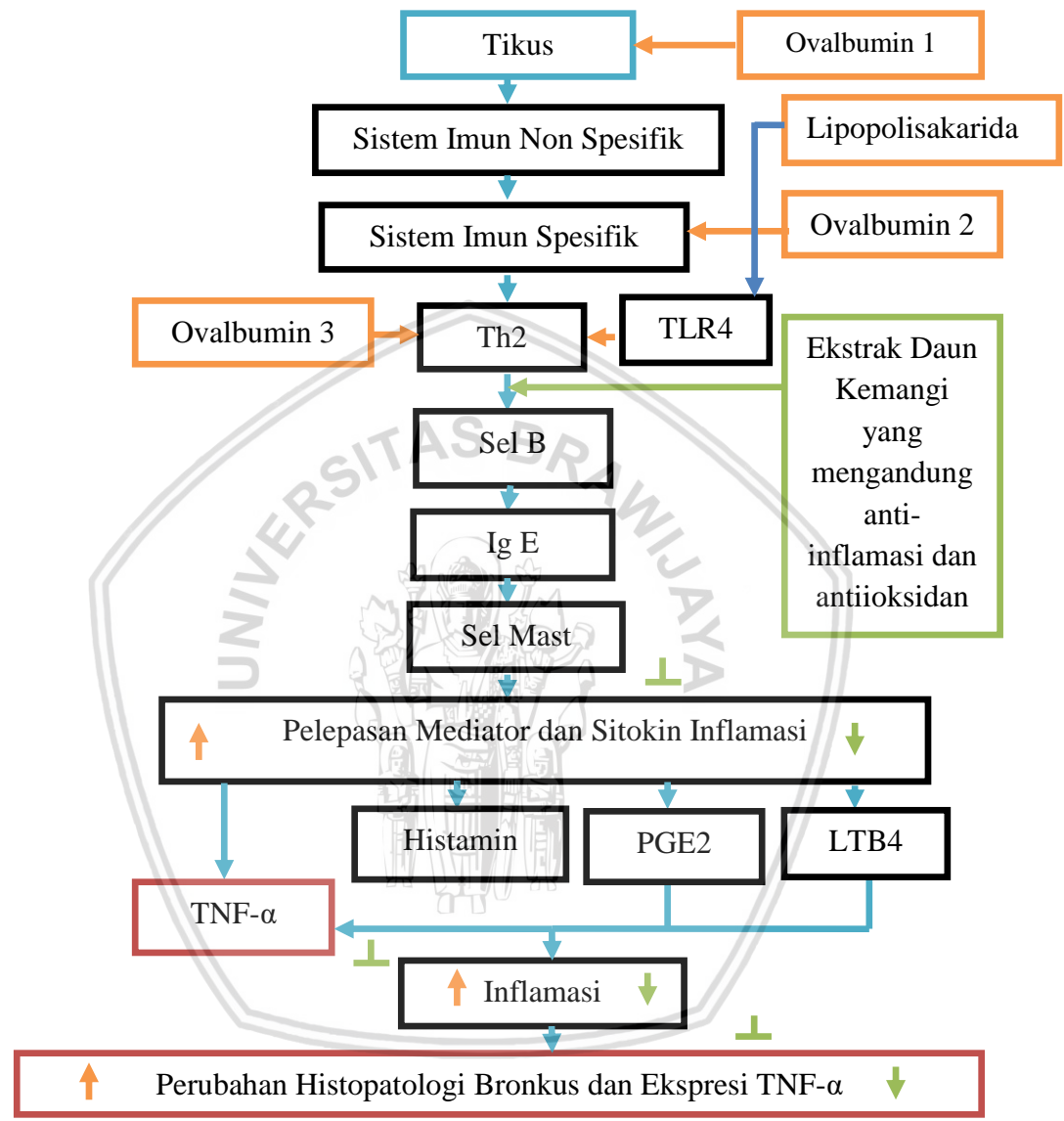
Berdasarkan penelitian Zhou dkk., (2015) paparan OVA dan LPS merupakan alergen yang memicu faktor penyebab resiko terjadinya asma. Pemeriksaan histopatologi pada penderita asma didapatkan kerusakan pada epitel. Paparan ovalbumin menyebabkan terlepasnya bronkial epitel, adanya sekresi cairan dan kerusakan di dalam bronkus dan bercak infiltrasi inflamasi dalam submukosa bronkial. Paparan ovalbumin juga menginduksi hiperplasia sel goblet, *haemoraghi*, *congesti*, dan edema interstitial. Paparan LPS pada tikus asma akan menyebabkan kerusakan struktur epitel silindris selapis semu bersilia jadi tidak beraturan dan terjadi pelepasan epitel dari membran basalis (**Gambar 2.2**).

Bentuk-bentuk kronis peradangan pada akhirnya menyebabkan *remodeling* saluran pernafasan disertai hiperplasia mukosa, hipertrofi membran basalis, dan hipertrofi otot polos (Paik dkk., 2014). Hal tersebut sesuai dengan pendapat Utomo (2012) bahwa LPS dari bakteri Gram negatif diketahui dapat menginduksi inflamasi pada saluran pernafasan sehingga mampu memperparah kondisi asma.



BAB 3 KERANGKA TEORI DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Teori



Keterangan :

- ↓ : Pengaruh Pemberian Terapi
- ↑ : Pengaruh Pemberian Alergen
- ↓ : Patomekanisme
- ⊥ : Penghambat
- : Variabel Kendali
- : Variabel Bebas (Alergen)
- : Variabel Tergantung
- : Variabel Bebas (Terapi)

Hewan coba dalam penelitian ini diberikan induksi berupa ovalbumin sebanyak 3 kali. Pemberian ovalbumin pertama berfungsi untuk mengaktifkan sistem imun nonspesifik yaitu mengenali antigen, mengolah serta mempresentasikan antigen ke sel T. Sel dendritik ini mampu mengaktifasi reaksi presentasi antigen sehingga mengeluarkan sitokin proinflamasi, yang kemudian menginduksi mediator proinflamasi lainnya ke daerah inflamasi.

Pemberian ovalbumin ke dua digunakan untuk menginduksi sel adaptif dan pemberian ovalbumin ketiga yaitu dengan cara inhalasi yang akan mengaktifkan Th2. Th2 membantu dalam memproduksi antibodi. Paparan LPS menyebabkan terikatnya dinding sel saluran pernafasan dengan LPS melalui bantuan *Lypopolisacharide Binding Protein* (LPB) dan mengantarkan LPS untuk dikenali CD14. Ikatan LPS dan CD14 akan melewati *tool-like receptor* – 4 (TLR4) sehingga dapat dikenali oleh sel dendritik. Sel dendritik akan menuju ke kelenjar limfe untuk mempresentasikan alergen kepada sel Th2. Sel Th2 menghasilkan sitokin IL-4 yang merangsang sel B berdeferensiasi menjadi sel B plasma. Sel B plasma akan memproduksi antibodi berupa IgE yang diikat silang oleh FcεR1 pada permukaan sel mast. Ikatan silang tersebut memacu degranulasi sel mast. Degranulasi sel mast akan menghasilkan histamin (penanda alergi). Histamin memicu bronkokonstriksi dan vasodilatasi, permeabilitas vaskuler meningkat (Baratawidjaja dan Rengganis, 2013). Mediator inflamasi lainnya seperti PGE2 mengakibatkan terjadinya dilatasi vaskuler dan bronkokonstriksi. Sedangkan LTB4 yang mengakibatkan kontraksi otot polos, peningkatan permeabilitas vaskuler, dan produksi mukus. Salah satu sitokin yang dilepas oleh

sel mast adalah sitokin $\text{TNF-}\alpha$ yang mengarahkan sel inflamasi seperti neutrofil dan eosinofil (Baratawidjaja dan Rengganis, 2013).

Sel neutrofil melepas metabolit oksigen, hidrogen peroksida, protease, dan sumber mediator seperti Prostaglandin (PG) dan Leukotrin (LT) (Mulia, 2000). Sel eosinofil melepaskan mediator seperti LT dan radikal bebas oksigen, yang bersifat sangat toksik untuk saluran nafas (PDPI, 2006; Mulia, 2000).

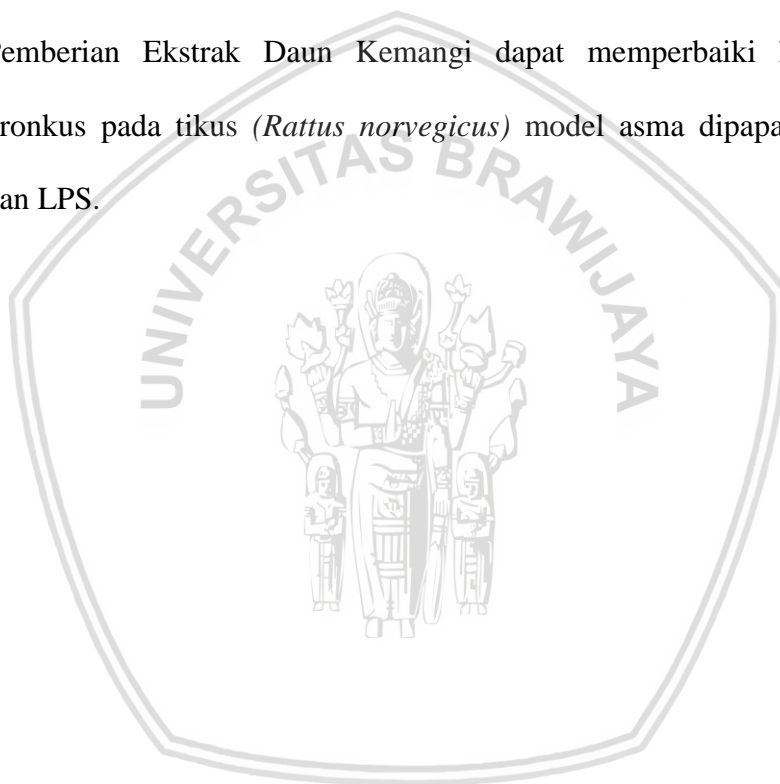
Produk yang dihasilkan oleh mediator inflamasi tersebut akan menyebabkan inflamasi yang mengarahkan makrofag alveolar dalam paru untuk menghasilkan oksidan reaktif dan nitrogen (ROS). Oksigen reaktif yang terlepas menyebabkan ketidakseimbangan antara radikal bebas (jumlah lebih banyak) dengan antioksidan sehingga menimbulkan stres oksidatif. Radikal bebas akan bereaksi dengan PUFA penyusun membran sel untuk mencapai keseimbangan disebut sebagai peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid akan menyebabkan kebocoran sel yang dapat mempengaruhi gambaran histopatologi bronkus (Caramori dan Papi, 2004).

Pemberian terapi dengan ekstrak kemangi mengandung flavonoid menunjukkan aktivitas berupa antioksidan yaitu dengan cara mendonasikan atom hidrogennya sehingga mengurangi radikal bebas (Yao dkk., 2004). Proses tersebut menghambat pengeluaran sitokin pro inflamasi dan menyebabkan aktivitas enzim proteolitik berkurang sehingga kerusakan epitel bronkus dapat berkurang.

3.2 Hipotesis Penelitian

Dari rumusan permasalahan, maka hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Pemberian Ekstrak Daun Kemangi dapat menurunkan ekspresi TNF- α bronkus pada tikus (*Rattus norvegicus*) model asma dipapar ovalbumin dan LPS.
2. Pemberian Ekstrak Daun Kemangi dapat memperbaiki histopatologi bronkus pada tikus (*Rattus norvegicus*) model asma dipapar ovalbumin dan LPS.



BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat

Penelitian akan dilakukan pada bulan 14 November- 19 Desember 2017 di Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya, Laboratorium Histopatologi Kedokteran Universitas Airlangga dan Laboratorium Histopatologi Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2 Bahan dan Alat Penelitian

4.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian kali ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar jantan dengan berat 150-200 gram umur 8-12 minggu, LPS1435/1449 dari bakteri *Porphyromonas gingivalis*, Ovalbumin (BioWorld), NaCl Fisiologis, AIOH₃, PBS, akuades, antibodi primer (Mouse Monoclonal Anti TNF- α), antibodi sekunder (Rabbit Anti Maouse IgG), daun kemangi, etanol 70%, Xylol, PFA 10%, alkohol, Na₂CO₃ dan H₂O₂.

4.2.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian kali ini adalah jas laboratorium, kandang tikus, kain *handling*, tempat makan dan minum tikus, sekam, spuit 1 mL, spuit 3 mL, scalpel, blade, gunting tajam-tumpul, gunting tajam-tajam, pinset chirurgis, pinset anatomis, baker glass, papan bedah, jarum, object glass, vortex, *Omron Compare Compressor Nebulizer*, timbangan dan mikroskop (Olympus BX51), timbangan analitik, plastik klip, alumunium foil, botol 50 mL, sonde lambung, sendok makan, lap steril, gelas *erlenmeyer*, toples blender dan oven.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu hewan coba berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar jantan dengan berat 150-200 gram dan berumur 8-12 minggu yang didapatkan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.4 Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap yang bersifat eksperimental laboratorik dengan membagi subyek menjadi lima kelompok. Setiap kelompok terdiri dari empat tikus. Kelompok A adalah tikus sehat sebagai kontrol negatif, kelompok B adalah tikus yang diinduksi OVA dan LPS (kontrol positif), sedangkan kelompok C, D, E (kelompok terapi) adalah tikus yang diinduksi OVA dan LPS dan ekstrak daun kemangi dengan dosis masing-masing sebesar 0,6 g/kg BB, 0,9 g/kg BB, dan 1,2 g/kg BB.

Tabel 4.1 Rancangan Penelitian

VARIABEL YANG DIAMATI	ULANGAN			
EKSPRESI TNF- α DAN HISTOPATOLOGI BRONKUS	1	2	3	4
Kelompok A (Kontrol negatif)				
Kelompok B (Kontrol positif)				
Kelompok C (Terapi dosis 0,6 g/kgBB)				
Kelompok D(Terapi dosis 0,9 g/kgBB)				
Kelompok E (Terapi dosis 1,2 g/kgBB)				

Penggunaan besaran sampel dapat digunakan rumus frederer (Kusriningrum, 2008) :

$$t (n-1) \geq 15$$

$$5 (n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 20/5$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t = Jumlah kelompok perlakuan

n = Jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan diatas, untuk 5 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan minimal 4 kali dalam setiap kelompok jadi total hewan coba yang dibutuhkan adalah 20 ekor.

4.5 Variabel Penelitian

Adapun variabel penelitian yang diamati yaitu :

Variabel bebas : Dosis Ekstrak Daun Kemangi, LPS dan OVA.

Variabel tergantung : Hisopatologi Bronkus dan Ekspresi TNF- α .

Variabel kontrol : Tikus (*Rattus norvegicus*) strain, lingkungan dan pakan

4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1 Preparasi Hewan Coba

Tikus diaklimasi terhadap lingkungan selama tujuh hari dengan pemberian makanan berupa ransum basal berisikan protein (20%), serat (5%) dan lemak (5-10%). Pakan tikus berbentuk pelet dan diberikan dua kali sehari. Air minum pada tikus diberikan secara *adlibitum*. Tikus dikandangkan pada kandang yang berukuran 17,5x23,75x17,5 cm, dengan jumlah 4 ekor. Kandang terbuat dari

plastik. Kandang berlokasi dari suara yang ribut dan bebas dari asap serta polutan. Alas kandang mudah dibersihkan.

4.6.2 Hewan Model Asma

Induksi OVA dan LPS dapat memicu respon imun. Pemberian ovalbumin dilakukan tiga kali. OVA I diinjeksikan secara intraperitoneal sebanyak 10 μg dengan 1,5 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$ dalam PBS 200 μL pada hari ke 0 dihitung setelah dilakukan aklimatisasi hewan coba, OVA II diinjeksikan secara intraperitoneal sebanyak 10 μg dengan 1,5 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$ dalam PBS 200 μL lagi pada hari ke 14. Injeksi LPS secara *intrasulkuler* pada sulkus gingitiva molar rahang atas kiri tikus selama 2 hari pada hari ke 10 dan 11 sebanyak 1 μg /ekor. OVA III diberikan secara inhalasi dalam NaCL steril sebanyak 1mg/mL selama 20 menit menggunakan tabung transparan yang dihubungkan dengan *Omron Compare Compressor Nebulizer* pada hari ke 21.

4.6.3 Pembuatan Ekstrak daun Kemangi

Menurut Restiyani dkk., (2015) Ekstraksi memiliki tujuan yaitu penarikan senyawa metabolit sekunder dari bahan yang digunakan yang memiliki aktivitas farmakologi. Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi selama 3 hari dengan remaserasi 24 jam. Simplisia yang digunakan yaitu 1 kg serbuk simplisia daun kemangi dengan pelarut etanol 70%. Selanjutnya hasil ekstraksi dievaporasi dengan suhu 40° C dimana merupakan suhu dibawah titik didih etanol bertujuan agar komponen dalam senyawa terlarut tidak rusak terutama komponen yang kurang stabil terhadap suhu yang tinggi. Ekstraksi pekat selanjutnya diuapkan di atas penangas air hingga cair. Analisa kualitatif uji flavonoid sebanyak 0.1 g

ekstrak ditambahkan 10 mL air panas dan dididihkan selama 5 menit. Setelah itu, disaring dan filtratnya digunakan untuk pengujian. Filtrat dimasukkan kedalam tabung reaksi lalu ditambahkan 0.5 g serbuk Mg, 1 mL HCl, dan 1 mL amilalkohol, kemudian dikocok kuat. Uji positif flavonoid menghasilkan warna merah tua atau merah muda.

4.6.4 Pemberian Terapi Ekstrak daun Kemangi

Pemberian terapi dimulai pada hari ke-22. Terapi daun kemangi diberikan pada kelompok C,D dan kelompok E. Ekstrak daun kemangi diberikan secara peroral melalui sonde lambung dengan dosis yang berbeda pada ketiga kelompok tersebut yaitu 0,6 g/kg BB, 0,9 g/kg BB, dan 1,2 g/kg BB. Pemberian terapi dilakukan satu kali per hari selama 14 hari.

4.6.5 Pengambilan Organ Paru (Bronkus)

Pada penelitian kali ini tikus dimatikan dengan cara diberikan anestesi dengan ketamin HCl 10% sebanyak 0,16 ml per tikus secara intramuskular. Diposisikan dorsal recumbency dan difiksasi dengan jarum di papan bedah pada bagian semua telapak kaki. Kulit pada bagian perut dicubit dengan tangan dan digunting kulit mulai dari daerah posterior hingga umbilicus dari arah kanan ke kiri thorax, kemudian dikuakkan ke bagian atas. Os sternum digunting hingga terbagi dua bagian dan diisolasi dari trachea, jantung, esofagus, sehingga didapati organ paru. Organ paru yang telah didapatkan kemudian dipisahkan dan dicuci dengan NaCl fisiologis (0,9 %) yang berfungsi untuk membersihkan dari berbagai kotoran yang ikut pada saat pembedahan, kemudian direndam dalam larutan PFA 10% dan disimpan pada suhu ruangan.

4.6.6 Pembuatan Preparat Histopatologi

Pembuatan preparat histologi dilakukan setelah pembedahan tikus kemudian sampel organ diambil. Sampel paru dicuci dengan NaCl fisiologis 0,9% bertujuan untuk menghilangkan darah, kemudian memisahkan bagian bronkus dari paru-paru. Proses pembuatan preparat histologi menurut Junquiera dan Carneiro (2007) terdiri dari fiksasi, dehidrasi, penjernihan, infiltrasi, *embedding*, sectioning dan penempelan digelas objek serta pewarnaan.

Fiksasi merupakan tahapan mencegah kerusakan jaringan dengan memasukkan jaringan ke dalam larutan PFA 10% kemudian di rendam dalam etanol 70% selama 24 jam. Tahapan selanjutnya adalah proses dehidrasi yaitu merendam jaringan dengan larutan etanol dengan konsentrasi bertingkat dari 70% selama 24 jam, kemudian dalam etanol 80% selama 2 jam, dilanjutkan etanol 90%, sampai absolut masing-masing membutuhkan waktu 20 menit. Kemudian dilakukan penjernihan dengan cara jaringan dipindahkan dari alkohol absolut kedalam larutan penjernihan yaitu xylol I (20 menit), xylol II (30 menit). Kemudian dilanjutkan dengan proses infiltrasi dilakukan dalam parafin cair yang ditempatkan dalam inkubator bersuhu 58-60°C.

Tahapan selanjutnya adalah *embedding* yang dilakukan dengan cara mencelupkan jaringan dalam parafin cair yang telah dituang ke dalam cetakan. Setelah beberapa saat parafin akan memadat. Pembuatan preparat dilakukan dengan memasukkan hasil *embedding* ke dalam penjepit (*block holder*). Sectioning diawali dengan mengatur ketebalan irisan dengan ukuran 4-5 μ m dengan menggunakan mikrotom. Hasil irisan dipindahkan dengan kuas ke dalam

air hangat 38-40°C untuk membuka lipatan dan meluruskan kerutan yang ada. Irisan yang sudah terentang sempurna diambil dengan gelas objek. Potongan terpilih dikeringkan dan diletakkan di atas *hot plate* 38-40°C sampai kering. Selanjutnya preparat disimpan dalam inkubator pada suhu 38-40°C lalu dilanjutkan dengan pewarnaan HE.

4.6.7 Pewarnaan Hematoxylin Eosin

Pewarnaan HE dilakukan dengan menggunakan zat pewarna hemaktosilin eosin. Proses pewarnaan diawali dengan proses deparafinasi dengan menggunakan xylol kemudian dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan memasukkan preparat ke dalam alkohol bertingkat konsentrasi alkohol yang digunakan 95%, 90%, 80% dan 70% secara berurutan selama tiga menit pada setiap larutan. Selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan dilanjutkan dengan merendam ke dalam akuades selama 5 menit. Sediaan diwarnai dengan pewarna Hemaktosilin selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 10 menit dan kemudian dicuci dengan akuades selama 5 menit. Kemudian dilakukan pewarnaan dengan zat pewarna Eosin selama 5 menit dan dicuci kembali dengan air yang mengalir selama 10 menit dan akuades selama 5 menit. Setelah sediaan diwarnai, dilakukan dehidrasi beberapa detik, dan dilanjutkan dengan alkohol absolut I, II, dan III masing-masing selama 2 menit. Setelah itu dilanjutkan dengan proses *clearing* dengan xylol I, II, dan III selama 3 menit. Terakhir dilakukan mounting (perekatan) menggunakan entellan serta ditutup menggunakan *coverglass*. Bagian yang diamati dari preparat yaitu sel epitel bronkus, otot polos dan kartilago hyaline.

4.6.8 Metode Imunohistokimia

Metode imunohistokimia diawali dengan proses deparafinisasi yaitu preparat direndam dalam larutan xylol I dan xylol II masing-masing selama 10 menit, kemudian direndam dalam etanol bertingkat (70%, 80%, 90% dan absolut) masing-masing selama 5 menit. Preparat dicuci menggunakan aquades sebanyak 3 kali selama 5 menit.

Proses selanjutnya dilakukan blocking enzim endogen peroksidase yaitu preparat ditetaskan H_2O_2 selama 5 menit. Preparat dicuci dengan PBS selama 5 menit sebanyak 3 kali. Proses ketiga *blocking* yaitu preparat ditetaskan *Casein Protein Block* selama 5 menit untuk mencegah ikatan nonspesifik pada antigen. Preparat dicuci dengan PBS selama 5 menit sebanyak 3 kali. Proses keempat preparat diinkubasi antibodi primer yaitu *Rat Monoclonal Anti TNF- α* (1:500) selama 1 jam pada suhu ruang. Preparat dicuci dengan PBS selama 5 menit sebanyak 3 kali. Proses kelima diinkubasi antibodi sekunder yaitu *Rabbit Anti Mouse IgG* selama 30 menit pada suhu ruang. Preparat dicuci dengan PBS selama 5 menit sebanyak 3 kali.

Proses keenam, preparat diinkubasi dengan *Polymere Anti-Rabbit* selama 30 menit pada suhu ruang. Preparat di cuci dengan PBS 5 menit sebanyak 3 kali. Proses ketujuh, preparat ditetsi DAB (1:20) selama 5 menit sebagai zat pewarna. Preparat dicuci dengan akuades selama 5 menit sebanyak 3 kali. Proses kedelapan, counterstaining preparat menggunakan *Hematoxylin* selama 5 menit. Preparat dicuci dengan akuades selama 5 menit sebanyak 3 kali. Tahapan terakhir, mounting preparat dengan entellan dan ditutup dengan *cover glass*. Preparat yang

hampir jadi diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Entellan sisa di sekitar preparat dihapus dengan xylol. Preparat diamati di bagian epitel bronkus menggunakan mikroskop, dihitung presentase TNF- α dengan *software* Immunorotation dan di analisis ragam ANOVA dengan uji Tukey $\alpha=5\%$.

4.6.9 Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan analisis kuantitatif statistik dan kualitatif deskriptif. Analisis kuantitatif statistik untuk ekspresi TNF- α dengan menggunakan imunorasio kemudian dimasukkan dalam Microsoft Office Excel dan SPSS untuk Windows uji analisis ragam *One Way ANOVA* untuk melihat pengaruh pemberian terapi, kemudian dilanjutkan dengan uji tukey untuk mengetahui perbedaan rata-rata tiap perlakuan. Analisis kualitatif deskriptif untuk pengamatan histopatologi bronkus yang dilihat dari kerusakan epitel bronkus dengan menggunakan mikroskop *Olympus* dengan perbesaran 400x yang dibandingkan dengan histologi normal bronkus.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Pemberian Terapi Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum cannum*) Terhadap Ekspresi TNF- α Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Jantan Model Asma

Ekspresi TNF- α ditunjukkan dengan adanya ekspresi warna kecoklatan pada bagian sitoplasma pada pewarnaan Imunohistokimia. Hasil penelitian mengenai pengaruh pemberian terapi ekstrak daun kemangi terhadap ekspresi TNF- α tikus model asma dengan metode imunohistokimia dapat dilihat dari gambaran kerusakan jaringan epitel ditunjukkan dengan gambar dan terdapat presentase ekspresi TNF- α pada tiap perlakuan (**Gambar 5.1**).

Pada kelompok negatif memiliki ekspresi TNF- α yang sangat sedikit dibandingkan dengan kelompok positif (**Gambar 5.1 A.B.**). Kelompok kontrol negatif merupakan kelompok tikus sehat sehingga ekspresi TNF- α yang sangat rendah, sedangkan kontrol positif merupakan kelompok tikus model asma yang diinduksi ovalbumin dan lipopolisakrida yang memiliki TNF- α yang sangat banyak. Pada kelompok penelitian akan ditemukan sitoplasma yang menyerap warna coklat dengan inti biru tua pada pewarnaan imunohistokimia, warna tersebut terbentuk karena adanya ikatan antara antibodi dan antigen pada jaringan. Kedua kelompok kontrol tersebut digunakan sebagai pembanding dari kelompok terapi C, D, dan E sehingga dapat dibandingkan pengaruh pemberian terapi terhadap kelompok 5 penelitian (**Gambar 5.1 C.D.E.**). Pada setiap perlakuan terdapat adanya ekspresi warna kecoklatan sitoplasma yang berbeda. Ekspresi TNF- α dapat terlihat pada bagian epitel, otot polos dan kartilago.



Adapun perbedaan presentase area ekspresi TNF- α bronkus (**Tabel 5.1**).

Tabel 5.1 Persentase area ekspresi TNF- α bronkus

Kelompok	Rata-rata Ekspresi TNF- α (pg/mL) \pm SD	Peningkatan Ekspresi TNF- α terhadap kontrol negatif	Penurunan Ekspresi TNF- α terhadap kontrol positif
Kontrol Negatif	2,3025 \pm 0,334 ^a	-	81,64%
Kontrol Positif	12,535 \pm 0,385 ^d	444,78%	-
Terapi dosis 0,6 g/kgBB	10,907 \pm 0,380 ^c	-	12,98 %
Terapi dosis 0,9 g/kgBB	5,9525 \pm 0,788 ^b	-	50,68 %
Terapi dosis 1,2 g/kgBB	2,6900 \pm 0,207 ^a	-	78,53 %

Keterangan : Perbedaan notasi a, b, c, d menunjukkan adanya perbedaan yang sangat signifikan antara kelompok perlakuan ($p < 0,01$).

Terapi ekstrak daun kemangi berbeda sangat nyata pada setiap perlakuan terhadap penurunan ekspresi TNF- α pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model asma yang diinduksi ovalbumin dan lipopolisakarida. Diketahui ekspresi TNF- α pada tikus kelompok A (kontrol negatif) terhadap kontrol positif menunjukkan ekspresi TNF- α yang rendah sebesar 81,64% dengan rata-rata ekspresi dan standart deviasi TNF- α yaitu 2,3025 \pm 0,334. Rata-rata ekspresi TNF- α pada kelompok kontrol negatif digunakan sebagai standar untuk menentukan adanya penurunan ekspresi TNF- α karena pengaruh perlakuan.

Ekspresi TNF- α pada kelompok kontrol positif meningkat sebesar 444,78% dan berbeda nyata jika dibandingkan dengan kontrol negatif dan memiliki rata-rata ekspresi dan standart deviasi TNF- α yaitu 12,535 \pm 0,385.

Ekspresi TNF- α kelompok terapi C,D, dan E yang diberikan terapi ekstrak daun kemangi dengan dosis 0,6 g/ kgBB, 0,9 g/ kgBB, dan 1,2 g/ kgBB terhadap tikus yang diberikan paparan ovalbumin dan lipopolisakarida mengalami penurunan dibanding kontrol positif asma (B). Penurunan ekspresi TNF- α sebesar 12,98 %, 50,68 %, dan 78,53 % terhadap kontrol positif berbeda nyata. Hal ini menunjukkan bahwa dosis 1,2 g/ kgBB adalah dosis terbaik dalam penurunan kejadian asma dengan penurunan ekspresi TNF- α sebesar 78,53 %. Dengan demikian penurunan ekspresi TNF- α dapat mengurangi fase inflamasi.

Tikus model asma yang diinduksi dengan ovalbumin dan lipopolisakarida menunjukkan gejala seperti sesak nafas. Pada penderita asma gejala yang selalu tampak adalah peningkatan frekuensi pernafasan. Peningkatan frekuensi pernafasan ini dikarenakan pada kondisi asma terjadi penyempitan jalan nafas sehingga udara yang akan masuk menjadi terbatas (Renanda, 2012). Hal tersebut dikarenakan TNF- α selalu diproduksi oleh tubuh yang berfungsi sebagai salah satu sistem pertahanan tubuh dan jumlahnya akan meningkat jika merespon adanya inflamasi. TNF- α dihasilkan dari fagosit mononuklear, makrofag dan sel T yang diaktivasi oleh antigen, sel NK dan sel mast (Baratawijaya dan Rengganis, 2013).

Tingginya ekspresi TNF- α pada kelompok positif menunjukkan aktivasi sel-sel pro-inflamasi yang berperan dalam proses inflamasi sebagai respon terhadap induksi LPS. Lipopolisakarida mengikat protein spesifik dalam plasma yaitu LPB. Kompleks LPS-LPB ini akan berikatan dengan CD₁₄ dan akan mempersentasikan LPS kepada TLR4 untuk mengaktivasi sel dendritik. Sel

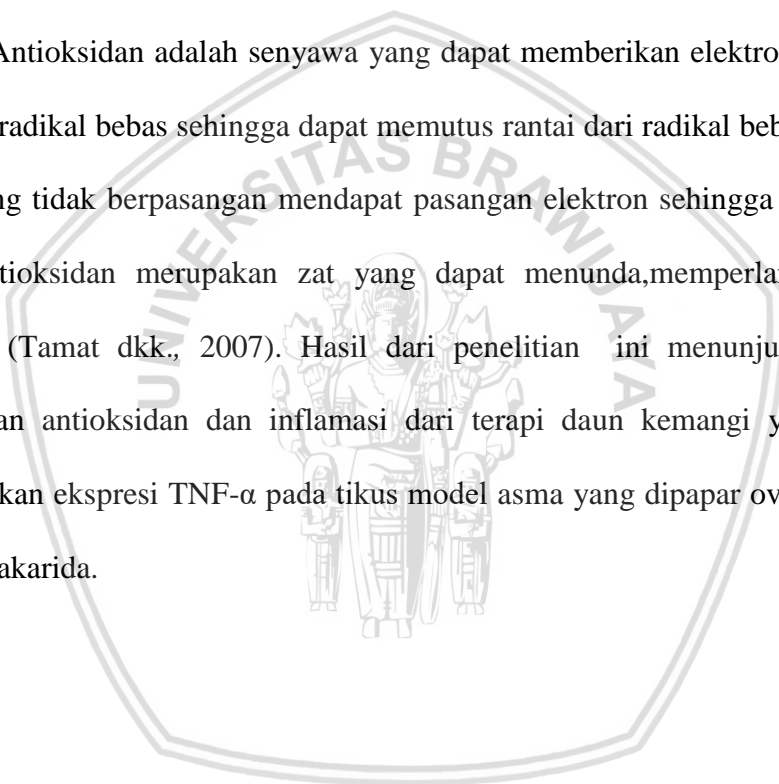
dendritik akan menuju ke kelenjar limfe untuk mempersentasikan alergen kepada sel Th₀. Sel Th₀ berdiferensiasi menjadi Th₂ dan menghasilkan sitokin berupa IL-4 yang merangsang sel B berkembang menjadi sel B plasma (Baratawijaya dan Rengganis, 2013).

Akibat paparan ovalbumin dan lipopolisakarida menyebabkan terjadinya aktivasi dari asam arakidonat untuk memunculkan mediator inflamasi seperti leukotrin dan prostaglandin. Mediator tersebut akan mempengaruhi fagositosis makrofag dan neutrofil. Makrofag tersebut akan menuju area inflamasi dan mengeluarkan beberapa sitokin, salah satunya TNF- α . TNF- α merupakan sitokin pro-inflamasi yang mengarahkan sel inflamasi (sel neutrofil dan eosinofil) ke sel target. Kadar TNF- α yang tinggi dalam tubuh dapat menyebabkan adanya suatu inflamasi sistemik (Baratawijaya dan Rengganis, 2013).

Penurunan ekspresi TNF- α yang terjadi disebabkan adanya kandungan antiinflamasi dan antioksidan yaitu cincin benzopiron yang ada dalam daun kemangi memiliki peran yang bekerja mengikat siklooksigenase (COX-1 dan COX-2) dan lipooksigenase (LOX) yang mengakibatkan penurunan PGE₂ dan LTB₄ pada bronkus sehingga inflamasi berkurang (Kandaswami dkk., 2007). TNF- α dapat menyebabkan *hemorrhagic necrosis* tertentu pada sel-sel tumor. Sitokin diproduksi karena aktivasi sel-sel T dan sel mast untuk meningkatkan produksi mediator pro inflamasi berupa histamin, leukotrien dan prostaglandin yang memiliki banyak aktivitas. Sitokin merangsang terjadinya peningkatan vasodilatasi pembuluh darah (Browning dkk., 2013). Sitokin juga berperan dalam

remodeling saluran nafas, yang dimana salah satu manifestasinya adalah penebalan epitel saluran nafas dan kerusakan bronkus (Sriwahyuni dkk., 2010).

Daun kemangi juga memiliki fungsi sebagai antioksidan, antiinflamasi, antibakteri, dan antifungi. Namun pada penyakit asma yang berpengaruh adalah antioksidan yang dapat digunakan sebagai penangkal radikal bebas dengan cara menstabilkan ikatan elektron pada radikal bebas sehingga stabil. Menurut Kosasih (2004), Antioksidan adalah senyawa yang dapat memberikan elektronnya kepada molekul radikal bebas sehingga dapat memutus rantai dari radikal bebas, sehingga atom yang tidak berpasangan mendapat pasangan elektron sehingga tidak reaktif lagi. Antioksidan merupakan zat yang dapat menunda, memperlambat proses oksidasi (Tamat dkk., 2007). Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa kandungan antioksidan dan inflamasi dari terapi daun kemangi yang mampu menurunkan ekspresi TNF- α pada tikus model asma yang dipapar ovalbumin dan lipopolisakarida.



5.2 Pengaruh Pemberian Terapi Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum cannum*) Terhadap Histopatologi Bronkus Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Jantan Model Asma

Perubahan histopatologi yang diamati adalah kerusakan epitel dari bronkus. Hasil penelitian terapi ekstrak daun kemangi (*Ocimum cannum*) terhadap histopatologi bronkus adalah adanya perbaikan epitel mendekati kondisi normal pada terapi ketiga dengan jumlah dosis 1,2 g/kg BB. Pada perlakuan kontrol negatif menunjukkan gambaran histopatologi bronkus yang normal. Bronkus yang sehat memiliki lapisan otot polos yang melapisi bronkus. Kontraksi otot polos akan membentuk mukosa yang berlipat-lipat pada bronkus. Epitel yang melapisi bronkus adalah epitel silindris selapis semu bersilia yang dikelilingi lamina propria tipis terdiri dari jaringan ikat. Pada kondisi normal akan terlihat kartilago hyalin yang kompak dan otot polos yang tipis (**Gambar 5.2 A**).

Pada kontrol positif (tikus model asma) sel-sel epitel mengalami kerusakan dan perubahan struktur dari epitel silindris selapis semu bersilia menjadi epitel yang tidak beraturan dan terdapat ruang renggang dimana diduga sebagai tempat terlepasnya epitel dari membran basalis, kartilago hyalin yang mengalami kerusakan dan terjadi hipertrofi otot polos (**Gambar 5.2 B**). Pada gambaran histopatologi bronkus yang diberikan terapi ekstrak daun kemangi (*Ocimum cannum*) dengan dosis 0,6 g/kg BB sudah mulai mengalami perbaikan struktur epitel dimana terdapat susunan epitel yang mulai membaik meskipun beberapa epitel terlepas, kartilago hyaline mulai terlihat kompak dan otot polos mulai mengalami sedikit menipis (**Gambar 5.2 C**).



Pada gambaran histopatologi bronkus tikus model asma yang diberikan terapi ekstrak daun kemangi (*Ocimum cannum*) dengan dosis 0,9 g/kg BB memberikan gambaran histopatologi bronkus yang membaik dengan ditandai dengan adanya *re-epitelisasi* pada bagian epitel yang mengalami kerusakan semakin mendekati kondisi normal dengan silia yang sudah sempurna, kartilago hyalin yang semakin kompak serta otot polos yang semakin mengalami penipisan (**Gambar 5.2 D**). Sedangkan pada kelompok terapi ekstrak daun kemangi (*Ocimum cannum*) dengan dosis 1,2 g/kg BB memberikan gambaran histopatologi bronkus yang membaik mendekati kondisi epitel pada kondisi normal yaitu epitelnya tidak terdapat renggang dan sudah mengalami *re-epitelisasi*, kartilago kompak hampir seperti kontrol negatif serta otot polos yang tipis (**Gambar 5.2 E**).

Asma merupakan suatu peradangan yang ditandai dengan obstruksi saluran pernafasan yang secara langsung maupun tidak langsung menginduksi kontraksi dari saluran pernafasan terutama otot polos dan meningkatkan ketebalan dinding saluran pernafasan yang disebabkan akibat kerusakan epitel, penebalan membran basalis, peningkatan vaskularisasi, dan peningkatan produksi mukus (Zuyderduyn dkk.,2008).

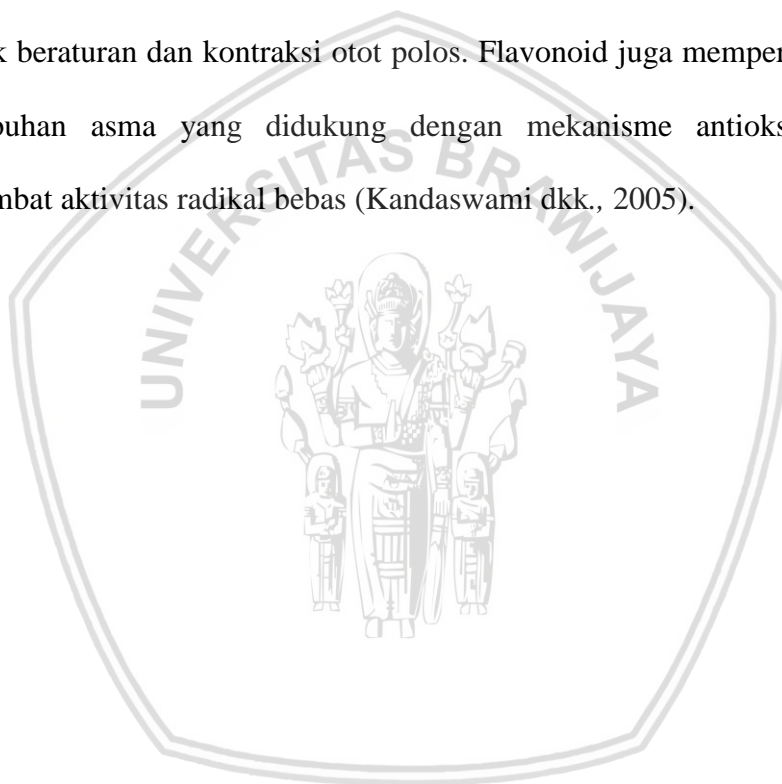
Menurut Davies (2014), epitel merupakan barier pertama yang berinteraksi secara langsung dengan paparan alergen. Ketika terdapat alergen maka epitel bronkus berinteraksi dengan alergen tersebut dengan membentuk suatu penghalang fisik berupa sekresi mukus, apabila paparan sampai tahap inflamasi maka akan terjadi kerusakan epitel. Dengan demikian, epitel bronkus memainkan

peran penting dalam homeostatik jaringan dan sistem imun spesifik. Sedangkan menurut Al-Muhsen dkk., (2011) *remodelling* saluran pernafasan pada pasien asma melibatkan berbagai perubahan patofisiologi berupa perubahan epitel, peningkatan massa otot polos, peningkatan jumlah fibroblast yang diaktifkan atau myofibroblast dan perubahan vaskular, sedangkan peran dari sitokin, kemokin dan mediator inflamasi lainnya juga merupakan penyebab terjadinya perubahan sel-sel struktural dari saluran nafas akibat asma.

Pemberian ovalbumin akan merangsang sel dendritik untuk memproduksi sel Th2 yang akan merangsang pembentukan IgE. Selain itu Th2 akan merangsang terjadinya proses peroksida lipid. Akibat Peroksidasi dari fosfolipid akan merusak protein dan lipid sehingga mengganggu struktur dan fungsi membran (Chung dan Marwick., 2010). Akibat rusaknya protein tersebut akan terjadi siklus COX dan LOX yang akan menghasilkan Prostaglandin E₂ yang mengakibatkan dilatasi vaskuler dan bronkokonstriksi, sementara LTB₄ berperan pada kontraksi otot polos, produksi mukus dan peningkatan permeabilitas vaskuler (Baratawijaya dan Rengganis, 2013). Sel-sel pada otot polos berperan aktif pada proses inflamasi dan *remodelling* (Widodo, 2012). Mediator inflamasi leukotrin dan prostaglandin E₂ juga menyebabkan berbagai perubahan patologi pada epitel, kartilago hyaline dan mukosa saluran pernafasan terutama pada bagian organ bronkus (Kim dkk., 2014).

Kandungan senyawa dalam daun kemangi diduga mengandung flavonoid yang berfungsi sebagai anti-inflamasi dan antioksidan yang mendukung proses penyembuhan asma. Flavonoid sebagai agen anti-inflamasi mampu membatasi

pelepasan mediator inflamasi dengan menghambat metabolisme siklooksigenase dan lipooksigenase, sehingga terjadi pembatasan jumlah sel inflamasi yang bermigrasi ke jaringan peradangan. Flavonoid ini akan menghambat pengeluaran mediator inflamasi diantaranya histamin, bradikidin, leukotrin, *platelet activating factor*, dan prostaglandin E₂ sebagai salah satu indikator *remodeling* dari saluran pernafasan terutama untuk perubahan epitel silinder selapis semu bersilia menjadi epitel tak beraturan dan kontraksi otot polos. Flavonoid juga mempercepat proses penyembuhan asma yang didukung dengan mekanisme antioksidan dalam menghambat aktivitas radikal bebas (Kandaswami dkk., 2005).



BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Pemberian terapi ekstrak daun kemangi (*Ocimum cannum*) Terhadap Ekspresi *Tumor Necrosis Factor* (TNF- α) Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Asma Yang Diinduksi Ovalbumin (OVA) Dan Lipopolisakarida (LPS) dapat menurunkan ekspresi TNF- α bronkus dengan hasil terbaik menggunakan dosis terapi 1,2 g/kg BB dengan penurunan sebesar 78,53%.
2. Pemberian terapi ekstrak daun kemangi (*Ocimum cannum*) Terhadap Gambaran Histopatologi Bronkus Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Asma Yang Diinduksi Ovalbumin (OVA) Dan Lipopolisakarida (LPS) dapat mempercepat proses *re-epitelisasi* dari kesembuhan pada asma dilihat dari perbaikan histopatologi bronkus yang terlihat.

6.2 Saran

Saran yang dapat disampaikan pada penelitian ini yaitu, perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengkaji pengaruh ekstrak daun kemangi (*Ocimum cannum*) terhadap asma dengan peningkatan dosis terapi sehingga didapatkan dosis yang optimal untuk suatu pengobatan.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Muhsen, S. Johnson, R., J. Hamid, Q. 2011. *Remodeling in asthma*. American Academy of Allergy, Asthma & Immunology.
- Armitage, D. 2004. *Rattus norvegicus*. Animal Diversity Web Online.at: // animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Rattus_norvegicus/. [Diakses pada 15 Juli 2017].
- Baratawidjaja, K.G. dan I., Rengganis. 2013. *Imunologi Dasar Edisi 10*. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Barlianto, W., S.C.K., Mohammad, K. Setyawati, dan M. Karyono. 2009. Pengembangan Model Mencit Alergi dengan Paparan Kronik Ovalbumin. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 2 (15):2-5.
- Beumer, C. W., Marty, R., Willem, R., Danielle and B. Ruud. 2003. Calf Interstitial Alkaline Phosphatase, A Novel Therapeutic Drug For Lypopolysacharide (Lps) Mediated Disease, Atteanuates LPS Toxicity in Mice And Piglet. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic*, 307(2); 737-744.
- Browning, J. L., Miatkowski, M., David, A. 2013. *Preparation and Characterization of Soluble Recombinant Heterotrimeric Complexes of Human Lymphotoxins* by guest on June 30.
- Chung, K.F. and Marwick, J.A. 2010. *Molecular mechanisms of oxidative stress in airways and lungs with refer- ence to asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. Annals of the New York Academy of Sciences. 1203, 85-91.
- Caramori, G. And A. Papi. 2004. *Oxidants and Asthma*. Thorax 59 (2): 170-173.
- Davies, D., E. 2014. *Epithelial Barrier Function and Immunity in Asthma*. Clinical and Experimental Sciences and the Southampton National Institute for Health Research Respiratory Biomedical Research Unit. University of Southampton Faculty of Medicine. Sir Henry Wellcome Laboratories. University Hospital Southampton. Southampton United Kingdom.
- Ewing, T. 2014. Feline Asthma. <http://www.vet.connell.edu.cfm>. [Diakses 15 Juli 2017].

- Global Initiative for Asthma. *Global strategy for the diagnosis, management and prevention of asthma*. NHLBI/WHO workshop report. 2011. Available at: <http://www.ginaasthma.org/>.
- Gunawan, G., Sulistia, S. Rianto, Nafrialdi, dan Elysabeth. 2007. *Farmakologi dan Terapi*. Jakarta : Departemen Farmakologi dan Terapeutik Universitas Indonesia.
- Heriprasetya, D. 2007. *Efek Pemaparan Ovalbumin Aerosol Terhadap Eosinofilia Bronkus pada Mencit Balb/C*. *Nexus Medicus. Jurnal Ilmiah Penelitian Medis*. 18 (1): 8-15.
- Huntingeston, J.A. and S. Pedro. 2001. Structure and Properties of Ovalbumin. *Journal of Chromatography*, B756 (1-2): 189-198.
- Iman, E.R.S, R. Ratih, E.N. Hasutji, Suryani dan T. Wiwiek. 2011. *Buku Ajar Mikrobiologi Veteriner 1*. Pusat Penerbitan dan Percetakan Unair (UAP): Surabaya.
- Junqueira, L. C and Carneiro J. 2007. *Basic Histology Text And Atlas*. McGraw-Hill Education, New York City.US.
- Kandaswami C, Lee LT, Lee PP, Hwang JJ, Ke FC, Huang YT, Lee MT. 2005. The Antitumor activities of Flavonoids. *In Vivo* 2005;19:895-909.
- Kardinan, A. 2003. *Selasih Tanaman Keramat Multimanfaat*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Katerine, M. Irvan, dan R. Erlina. 2014. Hubungan Tingkat Pengetahuan Mengenai Asma dengan Tingkat Kontrol Asma. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 3(1):58-60.
- Kim, B.J., and Hong, S.J. 2012. *Ambient air pollution and allergic diseases in children*. *Korean Journal of Pediatrics*. 55; 185-192.
- Kosasih, E. N., Setiabudhi, T dan Heryanto, H. 2004. *Peranan Antioksidan pada Lanjut Usia*. Jakarta: Pusat Kajian Nasional Masalah Lanjut Usia. Hal. 48-49,56-59.
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Fakultas Kedokteran Hewan. Airlangga Univercity Press. Surabaya.
- Missebukpo A., Kossi M., Abdoulatif D., Povi L-E., Kwashi E-G., Kodjo A. A., and Gbeassor M. 2013. Antioxidant Effect Of *Ixora Coccinea* Linn In A Rat

Model of Ovalbumin-induced Asthma. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology, Academic Journals Vol 7* (42).

Mulia dan Mulia, J. 2000. Perkembangan Patogenesis dan Pengobatan Asma Bronkial. Jakarta: Bagian Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti. *Jurnal Kedokteran Trisakti*, 19(3) : 125-132.

Nelson, F.I., C.L.L.Linnemann, and N.H.Weldon. 2007. Sub Lingual Immunotherapy for Respiratory allergic. *Journal Allergy Clin Immunol*. 2007. 117:1021-35.

Oktavia, S., Arifin, H., dan Irawati, R. 2015. Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum L.*) Terhadap pH dan Tukak Lambung Pada Tikus Putih Jantan. Fakultas Farmasi, Universitas Andalas (UNAND), Padang. *Jurnal Farmasi Higea*, Vol. 7, No. 2.

Paik S.H., Won-K. K., Jai-S.P., Choon-S.P., and Gong-Y.J. 2014. A Quantitative Study of Airway Changes on Micro-CT in a Mouse Asthma Model: Comparison With Histopathological Findings. *Allergy Asthma Immunol Res*. Vol. 6 No.1:75-82.

Persatuan Dokter Paru Indonesia. 2006. *Pedoman Diagnosis dan Penatalaksanaan Asma di Indonesia*.

Pertiwi, H.O.M., Aulanni'am, dan Herawati. 2014. Aktivitas Protease dan Gambaran Histopatologi Epitel Bronkus Akibat Pengaruh Terapi Ekstrak Daun Putri Malu (*Mimosa pudica Linn.*) Terhadap Hewan Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Asma. *Jurnal Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya*, 208 (1): 5-7.

Rasekh R.H., Hosseinzadeh L., Mehri S., Nejad M.K., Aslani M. Dan Tanbakoosazan F. 2012. Safety Assessment of *Ocimum basilium* Hydroalcoholic Extract in Wistar Rats : Acute and Subchronic Toxicity Studies. Mashhad University of Medical Sciences, *Irianin Journal of Basic Medical Science*.

Renanda, Risang. 2012. *Kadar Sekretori Immunoglobulin-E (s-IgE) dan Gambaran Histopatologi Otot Polos Bronkiolus pada Hewan Model Tikus (Rattus norvegicus) Asma yang Terpapar Ovalbumin dan Lipopolisakarida*. Malang.

Rengganis I. 2008. Diagnosis dan Tatalaksana Asma Bronkial. Departemen Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. *Majalah Kedokteran Indonesia*, Vol. 58, No.11: 445-446.

- Reinero, C.R. 2013. *Advance in teh Diagnosis and Treatment of Feline Asthma*. USA: University of Missouri Columbia. Western Veterinary Conference 2013.
- Restiyani, A.D., Yuniarni U., dan Hazar S. 2015. *Uji Aktivitas Anti Inflamasi Ekstrak Etanol Herba Kemangi (Ocimum americanum L.) terhadap Tikus Jantan Wistar*. Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Bandung.
- Sari, C.Y.I. 2013. Inflamasi Alergi pada Asma. *Jurnal Imunologi* (40) : 8. Fakultas Kedokteran. Jakarta : Universitas Indonesia.
- Singleton P. Dan D. Sainsbury. 2006. *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*. New Jersey: Willey Interscience.
- Sriwahyuni E., F.Q. Risza dan K.A. Yuni. 2010. Black Seed (*Nigella sativa*) Extract Prevent The Thickening of Bronchus and Increase The Circumference Of Bronchial Lumen in Asthma Model Mice. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, Vol. 26, No. 1.
- Sudarsono, Gunawan D., Wahyuono, Donatus I.A., dan Purnomo. 2002. *Tumbuhan Obat II (Hasil Penelitian, Sifat-sifat, dan Penggunaannya)*. Yogyakarta (ID): Pusat Studi Obat Tradisional Universitas Gajah Mada.
- Tamat, S. R., T. Wikanta dan L.S. Maulina. 2007. Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Senyawa Bioaktif dan Ekstrak Rumpun Laut Hijau *Ulva reticulata* Forsskal. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 5(1) :31-31.
- Tang, M.L. K, J.W. Wilson, and A.G. Stewert. 2006. *Airway Remodeling in Asthma: Current Understanding and Implication For Future therapies*. *Pharmacology & Therapeutic*, 112: 474488.
- Tjiptrosoepomo, G. 2002. *Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta)*. Cetakan VII. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- Utomo, H. 2012. Rapid Relief Mechanism of Allergic Rhinitis after” Assited Drainage” Therapy. Dental Hospital, Faculty of Dentistry, Airlangga University, Surabaya. *Journal of Dentistry Indonesia* 2012,19 (3): 57-64.
- Wang X., and P.J. Quinn. 2010. Review Lypopolysacharide. Biosynthetic Pathway And Structure Modification. *Progress in Lipid Research* (49) 97-107. Elsevier Ltd.

- Widodo, R, 2012. Patofisiologi dan Marker Airway Remodeling pada Asma Bronkial. *JRespir Indo Vol. 32, No. 2*.
- Yao L.H., Jiang Y.M., Shi J., Thomas B.F.A., Datta N., Singanusong R., dan Chen S. S. 2004. Flavanoids in Food and Their Health Benefit. Faculty of Agriculture, Naresuan University, Muang, Thailand. *Journal of Plant Foods for Human Nutrition* 59 : 113-122.
- Zhou Y., G.F. Wang., L. Yang., F.Liu., J.Q. Kang., R.L. Wang., W. Gu and C.Y. Wang. 2015. Treatment with 1,25 (OH)₂D₃ Induced HDAC₂ Expression and Reduced NF-Kb p65 Expression in a Rat Model of OVA-induced Asthma. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 48 (7): 654-664.
- Zosky, G.R., A.N. Larcombe, O.J. White, J.T. Burchell, and D.J. Turner. 2007. Ovalbumin Sensitised Rat are Good Model For Airway Hiperresponsiveness. *Clinical and Experimental Allergy*. 38: 829-838. *Journal of Immunology* 179: 5748-5749.
- Zuyderduyn S., M.B. Sukkar., A. Fust., S. Dhaliwal and J.K. Burgess. 2008. Treating Asthma Means Treating Airway Smooth Muscle Cells. *Eur Respir J* ; 32: 265-274.